

تأثیر توام اسانس گیاهان زنیان و رازیانه بر باکتری‌های /شریشیا کلای و کلستریدیوم /اسپرووژنر با استفاده از روش چکربرد

مریم حیدری سورشجانی^۱، مرتضی خمیری*^۱، یحیی مقصودلو^۱، حسین یوسفی^۲، محمود رفیعیان^۳، محبوبه کشیری^۱

^۱ گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، گلستان، ایران
^۲ گروه تکنولوژی و مهندسی چوب، دانشکده مهندسی چوب و کاغذ، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، گلستان، ایران

^۳ گروه فارماکولوژی و مرکز تحقیقات گیاهان دارویی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، شهرکرد، چهارمحال و بختیاری، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۰۵/۲۵ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۰۶/۳۰

چکیده

افزایش آگاهی در مورد عوارض سوء نگهدارنده‌های شیمیایی بر سلامت منجر به افزایش تمایل در بکارگیری نگهدارنده‌های طبیعی بویژه اسانس‌های گیاهی در محصولات دارویی و غذایی شده‌است. زنیان و رازیانه از جمله گیاهان دارویی معطری هستند که می‌توانند در این راستا مورد استفاده واقع شوند. در این پژوهش جهت بررسی و مقایسه اثرات ضد میکروبی اسانس‌های مورد آزمون، از روش انتشار در آگار استفاده گردید و روش رقیق‌سازی در محیط مایع نیز برای تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC) مورد استفاده قرار گرفت. به منظور بررسی برهمکنش اسانس زنیان و اسانس رازیانه و تعیین غلظت بازدارنده افتراقی از روش چکربرد استفاده شد. نتایج نشان داد که حداقل غلظت بازدارندگی اسانس‌های زنیان و رازیانه علیه باکتری /شریشیا کلای به ترتیب برابر با $1562/5 \mu\text{g/ml}$ و $12500 \mu\text{g/ml}$ و در مورد باکتری کلستریدیوم /اسپرووژنر این مقدار به ترتیب برابر با $1562/5 \mu\text{g/ml}$ و $50000 \mu\text{g/ml}$ بود. محاسبه غلظت بازدارنده افتراقی (FIC شاخص) حاکی از عدم وجود برهمکنش میان اسانس دو گیاه علیه هر دو باکتری مورد آزمون بود. به طور کلی می‌توان عدم وجود تأثیرات هم افزایی (سینرژیستی) و متضاد (آنتاگونیستی) بین دو اسانس زنیان و رازیانه را به یکسان بودن محل اثر این دو اسانس در باکتری‌های /شریشیا کلای و کلستریدیوم /اسپرووژنر مرتبط دانست. همچنین نتایج شناسایی ترکیبات تشکیل دهنده اسانس‌ها به کمک دستگاه GC/MS نشان داد که اجزای اصلی اسانس زنیان، تیمول (۴۹,۹۶ درصد)، پارا-سایمن (۲۲,۷۳ درصد) و گاما-ترپنین (۱۵,۳۲ درصد) و در مورد اسانس رازیانه، ترانس-انتول (۶۳,۸۸ درصد)، استراگول (۹,۹۷ درصد)، لیمونن (۷,۶۵ درصد) و فنچون (۵,۷۲ درصد) بودند.

کلمات کلیدی: اثر ضدباکتریایی، اسانس، چکر برد، رازیانه، زنیان

* mkhomeiri@yahoo.com

مقدمه

ممانعت از رشد میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا و عامل فساد در مواد غذایی معمولاً از طریق نگهدارنده‌های شیمیایی انجام می‌شود. این مواد شیمیایی به عنوان ترکیبات ضد میکروبی، رشد میکروارگانیسم‌های نامطلوب را مهار می‌کنند. برخی، باقی‌مانده بعضی از این مواد شیمیایی را با ایجاد سرطان در ارتباط می‌دانند (۱). ترکیبات ضد میکروبی گیاهان دارویی یکی از منابع ارزشمند و مفید در عرصه پزشکی، داروسازی و صنایع غذایی محسوب می‌شوند. با توجه به افزایش مقاومت احتمالی در میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا، جایگزینی موادی با عملکرد مناسب و متفاوت، علیه میکروب‌ها راه حل مناسبی می‌باشد. از جمله این مواد دارویی که می‌توانند مورد مصرف انسان قرار گیرند و دارای حداقل اثر جانبی باشند، محصولات گیاهی همچون اسانس‌های گیاهی می‌باشند. اسانس‌ها به دلیل دارا بودن ترکیبات منحصربه‌فرد، توانایی مقابله علیه طیف گسترده‌ای از میکروب‌ها، تک‌یاخته‌ها و حشرات را دارا می‌باشند (۲).

ترکیبات استخراج شده از گیاهان دارای فعالیت ضد میکروبی طبیعی در مقابل تعداد زیادی از باکتری‌های مولد فساد و بیماری‌زا هستند. بیشتر این ترکیبات از نوع متابولیت‌های ثانویه بوده و به علت وجود گروه‌های فعال فنولیک مشابه در ساختارشان با یکدیگر مشترک هستند (۳). متابولیت‌های ثانویه در واقع به صورت پیش‌سازهای غیر فعال ذخیره شده در بافت‌های گیاهی تولید می‌شوند و سپس در پاسخ به استرس‌های محیطی آزاد می‌گردند (۴). اسانس‌ها یا روغن‌های ضروری که به نام روغن فرار یا اتری نیز نامیده می‌شوند در واقع روغن‌های معطری هستند که از اجزای مختلف گیاهان یعنی گل، شاخه، غنچه، برگ، جوانه، پوست، ریشه، میوه و غیره بدست می‌آیند. عموماً اسانس‌ها بی‌رنگ می‌باشند و به ویژه زمانی که تازه تهیه شده باشند ولی با گذشت زمان به دلیل اکسیداسیون و رزینی شدن رنگ

آن‌ها تیره می‌شود برای این که مانع این تغییرات شد بایستی اسانس‌ها را در جای خشک، خنک و در ظروف در بسته و تیره از جنس شیشه نگهداری نمود (۵).

گیاه زنیان^۱ متعلق به تیره چتریان^۲ یکی از گیاهان دارویی است که در ایران، هند و مصر رشد می‌کند (۶). اسانس روغنی این گیاه دارای اثرات آنتی‌بیوتیکی علیه بعضی از باکتری‌های بیماری‌زا است. یکی از ترکیبات اصلی اسانس زنیان تیمول می‌باشد (۷). رازیانه یا بادیان سبز^۳ متعلق به تیره چتریان گیاهی است علفی دو یا چند ساله به ارتفاع (تا) ۲m دارای برگ‌های با بریدگی‌های زیاد می‌باشد. همه قسمت‌های گیاه معطر بوده و قسمت مورد استفاده گیاه معمولاً میوه یا دانه‌های کوچک آن است. دانه رازیانه به عنوان طعم دهنده در شکلات، شربت‌ها، دارو و غذا مصرف می‌شود. از جمله اثرات مهم آن در طب سنتی می‌توان به ضد نفخ، ضد اسپاسم، آنتی‌سپتیک، خلط آور اشاره کرد (۸).

مسمومیت‌های ناشی از *سالمونلا تیفی‌موریوم*^۴، *اشریشیا کلای*^۵ و *استافیلوکوکوس اورئوس*^۶ از بیماری‌های ناشی از مصرف مواد غذایی بوده که در بسیاری از کشورها جایگاه‌های اصلی را به خود اختصاص داده‌اند. اگر چه در ایران آمار دقیقی از شیوع مسمومیت با باکتری‌های فوق در دسترس نیست، اما با توجه شواهد می‌توان نتیجه گرفت که مسمومیت ناشی از آلودگی مواد غذایی با این باکتری‌ها گستردگی وسیعی داشته باشد (۹). *کلستریدیوم اسپروژنز*^۷ به دلیل داشتن متابولیسم مشابه بدون تولید سم، می‌تواند در مطالعات به عنوان یک میکروارگانیسم مدل برای *کلستریدیوم بوتولینوم*^۸ استفاده گردد. این باکتری معمولاً بیماری‌زا نمی‌باشد اما می‌تواند باعث ایجاد التهاب دستگاه گوارش گردد (۱۰).

با توجه به نتایج به دست آمده از پژوهش‌هایی که به بررسی محل اثر اسانس‌ها پرداخته اند، اینگونه استنباط می‌شود که

۵. *Escherichia coli*

۶. *Staphylococcus aureus*

۷. *Clostridium sporogenes*

۸. *Clostridium botulinum*

۱. *Carum copticum*

۲. *Umbelliferae*

۳. *Foeniculum vulgare*

۴. *Salmonella typhimurium*

استافیلوکوکوس اورئوس اثر آنتاگونیستی دارد. زمانی که این ترکیبات در برابر کلبسیلا پنومونیه^۳ استفاده شد بر اساس نسبت ترکیب شده اثرات سینرژیستی و افزایشی مشاهده شد. به طور کلی نتایج این بررسی نشان داد که استفاده همزمان ترکیبات ضد میکروبی طبیعی همچون اسانس‌های گیاهی همراه با آنتی‌بیوتیک‌ها ممکن است اثرات آنتاگونیستی نشان دهد (۱۳).

اثر ضد باکتریایی اسانس‌ها به روش‌های متفاوتی مورد بررسی قرار می‌گیرند. با توجه به تأثیر اسانس‌ها بر خواص ارگانولپتیکی مواد غذایی، تعیین دقیق حداقل غلظت مهارکنندگی^۴ (MIC) و حداقل غلظت کشندگی^۵ (MBC) آن‌ها و همچنین بررسی وجود خاصیت سینرژیستی بین اسانس‌ها با استفاده از تکنیک رقیق‌سازی در محیط مایع^۶ به منظور به حداقل رساندن میزان مصرف این مواد در صنایع غذایی و همچنین غلبه بر مقاومت باکتریایی مورد توجه می‌باشد. از همین رو در این پژوهش جهت تعیین حداقل میزان مهارکنندگی و حداقل غلظت کشندگی دو اسانس زنیان و رازیانه علیه باکتری‌های *اشریشیا کلای* و *کلستریدیوم اسپروژنز*، روش رقیق‌سازی در محیط مایع مورد استفاده قرار گرفت. همچنین به منظور مقایسه هرچه بهتر اثر ضد باکتریایی این دو اسانس علیه باکتری‌های مذکور روش انتشار در آگار به کمک دیسک انجام گرفت.

مواد و روش‌ها

تهیه اسانس‌های گیاهی

اسانس‌های زنیان و رازیانه از شرکت باریج اسانس تهیه شد.

باکتری‌های مورد آزمون

اشریشیا کلای (ATTC) و *کلستریدیوم اسپروژنز* (ATTC 19404) از مرکز کلکسیون میکروارگانیسم‌های صنعتی وابسته به سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران

خاصیت آنتی‌باکتریال اجزاء اصلی اسانس‌ها مربوط به خاصیت هیدروفوبیک آن‌ها بوده و به دیواره غشاء پلاسمایی میکروب بستگی دارد. نیروی محرکه پروتونی، میزان ATP درون سلولی و فعالیت کلی سلول‌های میکروبی مانند انتقال مواد حل‌شونده و تنظیم متابولیسم سلولی، تحت تأثیر افزایش مقدار برخی یون‌های ویژه بر روی و یا داخل غشاء پلاسمایی می‌باشد پس می‌توان گفت اسانس‌ها از طرق مختلف و با مکانیسم‌های متفاوتی باعث جلوگیری از رشد باکتری‌ها می‌شوند. درواقع ترکیبات فنولی منجر به آسیب غشاء سیتوپلاسمی شده و به موجب آن باعث تخریب قابلیت نفوذپذیری غشاء شده و به نوبه خود سبب آزاد شدن اجزای اصلی داخل سلول می‌شوند (۱۱).

تا کنون اثرات ضد باکتریایی اسانس‌های گیاهان مختلف علیه بسیاری از باکتری‌ها مورد بررسی قرار گرفته و نقش موثر آن‌ها در کنترل باکتری‌ها به اثبات رسیده‌است. همچنین برخی از مطالعات به بررسی وجود یا عدم وجود اثرات سینرژیستی میان اسانس‌های گیاهی با هم و با دیگر مواد ضد میکروبی همچون آنتی‌بیوتیک‌ها پرداخته‌اند. عروجعلیان^۱ و همکاران (۲۰۱۰) اثرات ضد باکتریایی اسانس‌های زنیان، زیره پارس و زیره سبز را علیه چند باکتری پاتوژن گرم مثبت و گرم منفی به کار بردند و نشان دادند که اسانس گیاهان خانواده چتریان اثرات ضد باکتریایی متوسط تا قوی دارند. در مجموع نتایج نشان داد اگرچه اثرهای بازدارندگی اسانس زیره پارس و زیره سبز کمتر از اسانس زنیان است، ولی کاربرد همزمان این دو اسانس به ویژه علیه باکتری‌های گرم مثبت دارای اثر سینرژیستی دارد (۱۲).

در همین ارتباط ورن^۲ و همکاران (۲۰۰۸) اثر ضد میکروبی چهار اسانس گیاهی در ترکیب با مواد ضد میکروبی رایج را مورد بررسی قرار دادند. نتایج نشان داد که استفاده همزمان اسانس‌های درخت چای، آویشن، نعناع فلفلی و رزماری در ترکیب با آنتی‌بیوتیک سیپروفلوکساسین علیه

4. Minimum Inhibitory Concentration

5. Minimum Bactericidal Concentration

6. Microdilution

1. Oroojalian

2. Vuuren

3. *Klebsiella pneumoniae*

خریداری شدند. باکتری‌ها پس از فعال‌سازی جهت تأیید خلوص کلنی‌ها روی محیط کشت مولر هینتون آگار کشت داده شدند.

تهیه سوسپانسیون میکروبی

مدت ۲۴h قبل از انجام آزمایش یک لوپ از هر باکتری به محیط کشت مولر هینتون براث تلقیح شد و در انکوباتور ۳۷°C در شرایط هوازی برای /شریشیا کلای و شرایط بی‌هوازی برای کلستریدیوم/اسپروژنز قرار گرفت. کدورت سوسپانسیون غلیظ میکروبی توسط محلول نرمال سالین ۰/۸۵ درصد با کدورت محلول ۰/۵ مک فارلند مقایسه و تنظیم گردید (۱۴)

تعیین خاصیت ضد باکتریایی

روش انتشار در آگار به کمک دیسک

سوسپانسیون میکروبی استاندارد به روش کشت چمنی در سطح محیط کشت مولر هینتون آگار کشت داده شد. سپس دیسک‌های کاغذی بلانک با فاصله‌ای معین از یکدیگر و از لبه پلیت روی آگار قرار داده شدند. ۲۰ μl از رقت‌های ۲۵۰۰۰، ۱۲۵۰۰، ۶۲۵۰ و ۳۱۲۵ از اسانس در محلول حاوی ۵ درصد دی‌متیل سولفوکساید (DMSO) روی دیسک‌ها اضافه شد. از دیسک آنتی بیوتیک کلرامفنیکل علیه /شریشیا کلای و کلستریدیوم/اسپروژنز با غلظت ۱۰ μg/ml به عنوان کنترل مثبت استفاده گردید (۱۵). محیط‌های کشت حاوی دیسک در دمای ۳۷°C در شرایط هوازی به مدت ۲۴h برای /شریشیا کلای و شرایط بی‌هوازی به مدت ۴۸h برای کلستریدیوم/اسپروژنز گرمخانه‌گذاری شدند. پس از گذشت این زمان، قطر هاله‌های بازدارنده ایجاد شده در اطراف دیسک‌ها با استفاده از خط کش اندازه‌گیری شد و نتایج مورد بررسی قرار گرفت (۱۶).

روش رقیق‌سازی در محیط مایع

در این روش ابتدا محیط کشت مولر هینتون براث همراه با ۰/۰۳ درصد آگار-آگار و ۵ درصد دی‌متیل سولفوکساید (DMSO) در آب مقطر حل و در دمای ۱۲۱°C به مدت ۱۵min استریل شد. رقت‌سازی دوتایی از غلظت

۵۰۰۰۰ μg/ml تا ۳۹۰/۶۲۵ با استفاده از همین محیط انجام شد. ابتدا در پلیت‌های ۹۶ چاهکی ۱۹۰ μl از محیط مولر هینتون براث حاوی اسانس تهیه شده توزیع گردید و در ادامه به هر یک از چاهک‌ها ۱۰ μl از سوسپانسیون باکتریایی دارای غلظت ۱۰^۷CFU/ml از باکتری‌های مورد آزمون اضافه شد. کنترل مثبت در این آزمایش ۱۹۰ μl محیط فاقد اسانس و ۱۰ μl از سوسپانسیون باکتریایی و نیز ۲۰۰ μl محیط حاوی اسانس و فاقد تلقیح باکتریایی به عنوان کنترل منفی برای هر چاهک در نظر گرفته شد. پس از آنکه محتویات هر چاهک به خوبی مخلوط شد پلیت به مدت ۲۴h در دمای ۳۷°C در شرایط هوازی برای /شریشیا کلای و شرایط بی‌هوازی به مدت ۴۸h برای کلستریدیوم/اسپروژنز گرمخانه‌گذاری شدند. پس از این مدت زمان با اندازه‌گیری میزان جذب در طول موج ۶۳۰ nm، رشد میکروبی و کدورت چاهک‌های حاوی اسانس و باکتری در مقایسه با چاهک‌های کنترل تعیین شدند. کمترین غلظت اسانس که از رشد باکتری جلوگیری نمود و کدورت یا رسوبی در محیط مورد استفاده در چاهک مربوطه مشاهده نشد به عنوان حداقل غلظت بازدارندگی منظور گردید. این قسمت مطابق با دستورالعمل کمیته ملی استانداردهای آزمایشگاه‌های بالینی (NCCLS) انجام گرفت (۱۷).

جهت تعیین حداقل غلظت باکتری‌کشی میزان ۱۵۱ μl از رقت‌هایی که کدورتی در آن‌ها مشاهده نشد به پلیت‌های حاوی محیط کشت مولر هینتون آگار انتقال داده شد و پلیت‌ها در دمای ۳۷°C به مدت ۲۴h در شرایط هوازی برای /شریشیا کلای و به مدت ۴۸h در شرایط بی‌هوازی برای کلستریدیوم/اسپروژنز گرمخانه‌گذاری شدند. غلظتی که هیچ کلنی قابل شمارشی در آن مشاهده نگردید به عنوان حداقل غلظت باکتری‌کشی تعیین گردید (۱۸)

ارزیابی اثر ترکیبی اسانس زنیان و اسانس رازیانه

به منظور بررسی برهمکنش ضد میکروبی اسانس زنیان و اسانس رازیانه، غلظت بازدارنده افتراقی^۲ تعیین گردید. در واقع غلظت مهاري مشترك كسري از غلظت ماده مهاركننده

². Fractional Inhibitory Concentration

¹. Muller Hinton Agar

در حال ترکیب، نسبت به وقتی که همان ماده به تنهایی استفاده می‌شود را نشان می‌دهد. برای تعیین FIC روشی مرسوم به چکر بورد استفاده شد و FIC از رابطه زیر محاسبه گردید (۱۹).

$$\text{FIC}_c = \text{MIC}_c \text{ Com} / \text{MIC}_c \text{ A} \quad \text{معادله ۱}$$

$$\text{FIC}_f = \text{MIC}_f \text{ Com} / \text{MIC}_f \text{ A} \quad \text{معادله ۲}$$

$$\text{FIC}_{\text{index}} = \text{FIC}_c + \text{FIC}_f \quad \text{معادله ۳}$$

FIC_c - غلظت بازدارنده افتراقی مربوط به زنیان،

$\text{MIC}_c \text{ Com}$ - حداقل غلظت مهارکنندگی ترکیبی زنیان،

$\text{MIC}_c \text{ A}$ - حداقل غلظت مهارکنندگی منفرد زنیان

FIC_f - غلظت بازدارنده افتراقی مربوط به رازیانه،

$\text{MIC}_f \text{ Com}$ - حداقل غلظت مهارکنندگی ترکیبی رازیانه،

$\text{MIC}_f \text{ A}$ - حداقل غلظت مهارکنندگی منفرد رازیانه

چاهک به $200 \mu\text{l}$ رسید. چهار چاهک نیز به عنوان کنترل مثبت ($190 \mu\text{l}$ محیط کشت مولر هینتون آگار و 10°C سوسپانسیون میکروبی) در نظر گرفته شد. پس از آنکه محتویات هر چاهک به خوبی مخلوط شد مطابق بخش قبل، میکروپلیت در دمای 37°C به مدت 24h در شرایط هوازی برای /شریشیا کلای و به مدت 48h در شرایط بی‌هوازی برای کلستریدیوم /اسپورژوئر گرمخانه گذاری شد. پس از طی این زمان‌ها مقدار 50°C از معرف تری فنیل تترازولیوم کلراید^۵ (5mg/ml) در تمام چاهک‌های میکروپلیت ریخته و مجدداً به مدت 3h در دمای 37°C گرمخانه گذاری گردید یک غلظت بالاتر از آخرین غلظتی که رنگ قرمز تترازولیوم را به خود گرفت بعنوان MIC ترکیبی باکتری در نظر گرفته شد (۲۲).

معرف رنگی تری فنیل تترازولیوم کلراید یک معرف رنگی رشد است که برای شمارش کلنی‌های میکروبی در محیط کشت جامد استفاده زیادی می‌شود و در آنالیزهای میکروبیولوژی مواد غذایی کاربرد زیادی دارد. این معرف در حالت اکسید بی‌رنگ است ولی وقتی توسط میکروارگانیسم‌ها احیاء شود به علت تشکیل فورمازان قرمز رنگ می‌شود (۲۳).

جداسازی و شناسایی ترکیبات تشکیل دهنده اسانس‌ها

جهت جداسازی و شناسایی ترکیبات تشکیل دهنده اسانس‌های زنیان و رازیانه حجم $1 \mu\text{l}$ از هر یک از اسانس‌ها به دستگاه GC/MS تزریق شد. مشخصات دستگاه عبارت بودند از: مدل 6890 (HP) Hewlett Packard، درجه حرارت محل تزریق 240°C ، برنامه ریزی حرارتی: 50°C - 300°C ، نوع ستون: HP-5MS، گاز حامل: هلیوم، سرعت جریان گاز: $1/5\text{ml/min}$ ، طول ستون: 30m ، قطر داخلی $250 \mu\text{m}$ و انرژی یونیزاسیون 70 eV . با توجه به الگوی خروج آلکان‌های نرمال، شاخص بازداری و اندیس کواتس

بررسی برهم کنش‌های ضد میکروبی به شکل یکی از چهار حالت احتمالی هم افزایی^۱، افزایشی^۲، عدم تأثیر^۳ و یا کاهش اثر^۴ می‌باشد. بر اساس گوتیرز^۶ و همکاران (۲۰۰۸) و بصری^۷ و همکاران (۲۰۱۴)، مقادیر شاخص FIC کمتر از 0.5 نشان دهنده‌ی اثر هم افزایی، مقادیر بین 0.5 تا 1 اثر جمع‌پذیر (افزایشی)، مقادیر بین 1 تا 4 عدم تأثیر و مقادیر بالاتر از 4 ناشی از اثر متضاد (کاهش اثر) می‌باشد (۲۰، ۲۱).

ابتدا غلظت‌های متوالی دو تایی از اسانس زنیان و اسانس رازیانه به طور جدا گانه همانند بخش قبل، تهیه شد. در هر ردیف به ترتیب از چپ به راست $95 \mu\text{l}$ از غلظت‌های $10000 \mu\text{g/ml}$ تا غلظت $781.25 \mu\text{g/ml}$ اسانس زنیان ریخته شد. به همین ترتیب در هر ستون به ترتیب از بالا به پایین $95 \mu\text{l}$ از غلظت‌های $10000 \mu\text{g/m}$ تا غلظت $781.25 \mu\text{g/m}$ اسانس رازیانه ریخته شد. در نهایت میکروپلیتی داشتیم که در آن هر کدام از غلظت‌های یک اسانس در ترکیب با تمامی غلظت‌های اسانس دیگر بودند. در ادامه به هر چاهک $101 \mu\text{l}$ از رقت 10^7CFU/ml سوسپانسیون باکتری اضافه شد (به-طوری که غلظت نهایی سوسپانسیون باکتریایی در هر چاهک معادل 10^5CFU/ml باشد) و بدین ترتیب حجم نهایی هر

5. Antagonistic

6. Gutierrez

7. Basri

8. Triphenyl Tetrazolium Chloride

1. Checkerboard Assay

2. Synergistic

3. Additive

4. Indifferent

و تطبیق آن‌ها با الگوهای کتابخانه‌ای، طیف مربوط به هر جسم تفسیر و ترکیبات عمده تشکیل دهنده اسانس‌ها شناسایی شدند.

طرح آماری

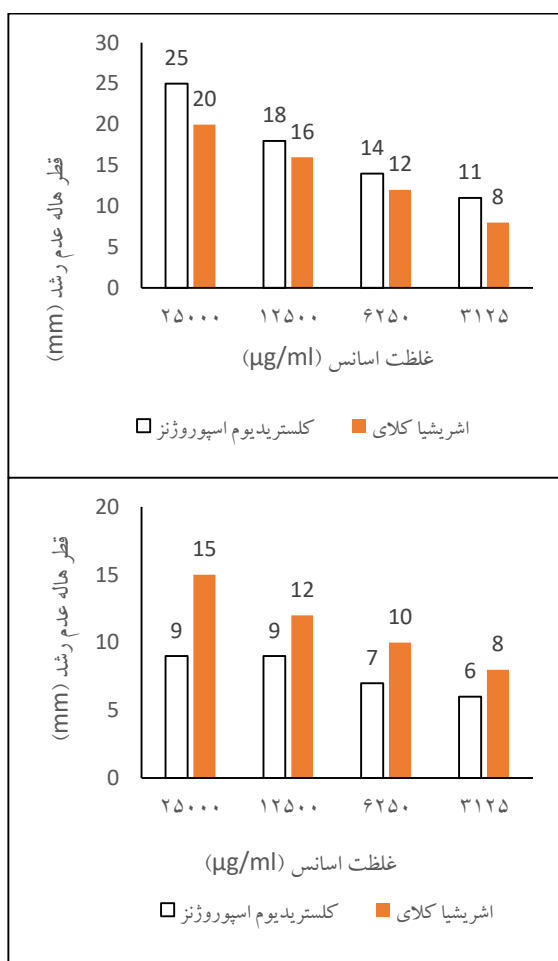
داده‌های حاصل، به روش آنالیز واریانس یک طرفه^۱ با استفاده از نسخه ۱۸ نرم افزار SPSS مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفتند. همچنین برای مقایسه میانگین‌ها از روش آزمون چند دامنه‌ای Duncan در سطح احتمال ۵ درصد استفاده شد.

نتایج

انتشار در آگار به کمک دیسک

نتایج مقایسه کلیه میانگین‌ها در روش انتشار در آگار نشان داد که غلظت $25000 \mu\text{g/ml}$ اسانس‌های زنیان و رازیانه بیشترین اثر بازدارندگی را بر هر دو باکتری مورد آزمون داشتند. همچنین مشخص شد قطر هاله عدم رشد باکتری *اشریشیا کلای* در مقابل اسانس رازیانه، بیشتر از این قطر برای باکتری *کلستریدیوم اسپروژنز* بود اما به طور کلی اسانس زنیان قدرت بازدارندگی بیشتر علیه باکتری *کلستریدیوم اسپروژنز* و باکتری *اشریشیا کلای* در مقایسه با اسانس رازیانه نشان داد (نمودار ۱ و ۲). قطر هاله‌ی عدم رشد برای باکتری *کلستریدیوم اسپروژنز* و باکتری *اشریشیا کلای* در مقابل دیسک آنتی بیوتیک کلرامفنیکل به ترتیب برابر با ۴۳ و ۳۲mm بود.

نتایج مقایسه میانگین قطر هاله‌های عدم رشد نیز حاکی از آن بود که میان تمامی غلظت‌های اسانس‌های زنیان و رازیانه در مقابل باکتری *اشریشیا کلای* تفاوت معنی‌دار وجود داشت. میانگین هاله‌های عدم رشد باکتری *کلستریدیوم اسپروژنز* در غلظت‌های $6250 \mu\text{g/ml}$ و $3125 \mu\text{g/ml}$ هر دو اسانس تفاوت معنی‌داری نداشتند. همچنین غلظت‌های $25000 \mu\text{g/ml}$ و $12500 \mu\text{g/ml}$ اسانس رازیانه در برابر باکتری *کلستریدیوم اسپروژنز* نیز دارای تفاوت معنی‌دار نبودند.



نمودار ۲. میانگین قطر هاله عدم رشد *کلستریدیوم اسپروژنز* و *اشریشیا کلای* بر حسب mm در برابر اسانس رازیانه (قطر دیسک نمونه و آنتی‌بیوتیک ۶mm بود).

رقیق‌سازی در محیط مایع

نتایج تعیین حداقل غلظت بازدارندگی و حداقل غلظت کشندگی اسانس‌های زنیان و رازیانه علیه باکتری‌های *کلستریدیوم اسپروژنز* و *اشریشیا کلای* در جدول شماره ۱ آورده شده است. با توجه به این نتایج نیز می‌توان گفت اسانس زنیان دارای اثر ضد باکتریایی قوی تری نسبت به اسانس رازیانه می‌باشد.

اثر ترکیبی اسانس زنیان و اسانس رازیانه

جدول شماره ۲ نتایج تعیین حداقل غلظت مهاری مشترک (FIC) را نشان می‌دهد. مشخص گردید که MIC باکتری باکتری *اشریشیا کلای* در مقابل اسانس زنیان در حالت

¹. ANOVA

جدول ۱. نتایج حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC) اسانس‌های زنیان و رازیانه با استفاده از الایزاید (بر حسب $\mu\text{g/ml}$)

رازیانه		زنیان		واکنش گرم	باکتری مورد آزمون
MBC	MIC	MBC	MIC		
۵۰۰۰۰	۵۰۰۰۰	۶۲۵۰	۱۵۶۲,۵	+	کلستریدایم/اسپوروژنر ATTC 19404
۵۰۰۰۰	۱۲۵۰۰	۱۲۵۰۰	۱۵۶۲,۵	-	اشریشیا کلای ATTC 25922

جدول ۲. نتایج برهمکنش فعالیت ضد میکروبی اسانس‌های زنیان و رازیانه

باکتری مورد آزمون	واکنش گرم	FIC زنیان	FIC رازیانه	شاخص FIC	تأثیر متقابل
کلستریدایم/اسپوروژنر ATTC 19404	+	۲	۰,۵	۲,۵	عدم تأثیر
اشریشیا کلای ATTC 25922	-	۲	۱	۳	عدم تأثیر

ترکیبات شیمیایی تشکیل‌دهنده این اسانس عبارت بودند از: ترانس انتول (۶۳/۸۸ درصد)، استراگول (۹/۹۷ درصد)، لیمونن (۷/۶۵ درصد) و فنچون (۵/۷۲ درصد).

بحث و نتیجه‌گیری

فعالیت ضد میکروبی اسانس‌ها علیه طیف گسترده‌ای از میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا، از جمله باکتری‌های شاخص عفونت و مسمومیت غذایی اثبات گردیده‌است. فعالیت‌های ضد میکروبی اسانس‌ها، به تعدادی از ترکیبات ترپنئیدی و فنلی ترکیبات شیمیایی و گروه‌های فعال موجود در اسانس‌ها، نسبت و برهمکنش‌های بین آن‌ها، نسبت داده می‌شود (۲۴). مشخص شده‌است که اسانس‌ها دارای ترکیباتی مانند تیمول، گاما-ترپنین و پارا-سیمن، ترانس انتول و ... هستند که خاصیت ضد باکتریایی شدید آن‌ها گزارش شده است (۵). بررسی‌های صورت گرفته نشان‌دهنده آن است که اثر ضد میکروبی عصاره و اسانس رازیانه بیشتر در ارتباط با حضور انتول، استراگول، فنچون، لیمونن و فنچون بوده و در اسانس زنیان نیز تیمول، پارا-سیمن و گاما-ترپنین مسئول ایجاد خاصیت ضد میکروبی می‌باشند (۲۵، ۲۶). انور^۱ و همکاران (۲۰۰۹) نشان دادند اسانس دانه رازیانه با ترکیب ترانس-انتول (۶۹/۸۷ درصد)، فنچون (۱۰/۲۳ درصد)، استراگول (۵/۴۵ درصد) و لیمونن (۵/۱۰ درصد) در برابر

ترکیبی بیشتر تر از حالت منفرد و برابر با $3125 \mu\text{g/ml}$ بوده و در مقابل اسانس رازیانه در حالت ترکیبی و در حالت منفرد یکسان بوده و برابر با $12500 \mu\text{g/ml}$ بود. همچنین در مورد باکتری کلستریدایم/اسپوروژنر نیز مشاهده شد که MIC این باکتری در مقابل اسانس زنیان در حالت ترکیبی برابر با $3125 \mu\text{g/ml}$ و بیشتر از حالت منفرد و در مقابل اسانس زنیان برابر با $25000 \mu\text{g/ml}$ و کمتر از حالت منفرد این اسانس بود.

به طور کلی نتایج حاصل از این بخش نشان می‌دهد که بر اساس FIC شاخص، ترکیب اسانس‌های زنیان و رازیانه علیه باکتری‌های کلستریدایم/اسپوروژنر و اشریشیا کلای هیچ نوع تأثیری چه از نوع سینرژیستی و چه از نوع آنتاگونیستی ندارند.

ترکیبات شیمیایی اسانس‌ها

ترکیبات شیمیایی تشکیل‌دهنده اسانس زنیان همراه با درصد فراوانی هر جز در جدول ۲ ارائه گردیده‌است. عمده‌ترین ترکیبات شیمیایی تشکیل‌دهنده این اسانس تیمول (۴۹/۹۶ درصد)، پارا-سیمن (۲۲/۷۳ درصد) و گاما-ترپنین (۱۵/۳۲ درصد) گزارش شدند.

ترکیبات شیمیایی تشکیل‌دهنده اسانس رازیانه همراه با درصد فراوانی هر جز در جدول ۲ ارائه شده‌است. عمده‌ترین

¹. Anwar

جدول ۳. ترکیبات شناسایی شده اسانس گیاه زنیان

ردیف	اجزای تشکیل دهنده اسانس زنیان	شاخص بازداری (RI)	درصد
۱	α -Pinene	۹۴۱	۰,۷
۲	Camphene	۹۶۵	۰,۵
۳	β -pinene	۹۸۰	۰,۲
۴	β -myrcene	۹۹۵	۰,۴۵
۵	2-Carene	۱۰۰۳	۰,۵
۶	α -Terpinene	۱۰۲۱	۱,۳
۷	p-Cymene	۱۰۳۲	۲۲,۷۳
۸	Limonene	۱۰۵۱	۰,۹
۹	γ -Terpinene	۱۰۶۲	۱۵,۳۲
۱۰	Terpinene-4-ol	۱۱۷۳	۰,۳
۱۱	Thymol	۱۲۹۲	۴۹,۹۶
۱۲	Carvacrol	۱۳۱۰	۲,۶۱
جمع کل			۹۵,۴۵

RI: Retention Index

جدول ۴. ترکیبات شناسایی شده اسانس گیاه رازیانه

ردیف	اجزای تشکیل دهنده اسانس رازیانه	شاخص بازداری (RI)	درصد
۱	α -Pinene	۹۳۹	۰,۹۶
۲	Camphene	۹۶۰	۰,۱۶
۳	Sabinene	۹۷۶	۰,۳۸
۴	β -myrcene	۹۹۱	۰,۵۵
۵	Limonene	۱۰۴۱	۷,۶۵
۶	γ -Terpinene	۱۰۶۵	۰,۲۲
۷	Fenchone	۱۰۸۷	۵,۷۲
۸	Comphor	۱۱۴۵	۰,۳۵
۹	Methyl Chavicol	۱۱۹۴	۳,۵۵
۱۰	Estragole	۱۲۰۰	۹,۹۷
۱۱	Cis-anethole	۱۲۵۳	۲,۷۶
۱۲	Trans-anethole	۱۲۸۸	۶۳,۸۸
۱۳	α -copaene	۱۳۸۰	۰,۵۶
۱۴	β -caryophyllene	۱۴۲۱	۰,۴۶
جمع کل			۹۷,۳۷

RI: Retention Index

دو گونه باکتریایی و سه قارچ بیماری‌زا اثر ضد میکروبی قابل توجهی داشت (۲۷). همچنین دیانو^۱ و همکاران (۲۰۱۴) در بررسی خاصیت ضدباکتریایی اسانس دانه رازیانه مشاهده کردند که از میان ۲۸ ترکیب شناسایی شده‌ی اسانس رازیانه،

ترانس-انتول، استراگول، لیمونن و فنچون بیشترین مقدار را به خود اختصاص دادند و این اسانس علیه باکتری‌های مختلف گرم مثبت و گرم منفی خاصیت ضد باکتریایی نشان داد (۲۸). کاظمی^۲ (۲۰۱۵) به بررسی خاصیت ضدالتهابی و

^۱. Diao

^۲. Kazemi

ضد میکروبی اسانس زنیان پرداخت و نشان داد که تیمول (۲۶/۰۳ درصد)، پارا-سایمن (۲۳ درصد) و گاما-تریپنین (۲۳ درصد) بیشترین ترکیبات تشکیل دهنده‌ی اسانس زنیان می‌باشند. همچنین مشاهده شد که این اسانس علیه باکتری‌ها و قارچ‌های مورد آزمون نیز اثر ضد باکتری و ضد قارچی دارد (۲۹). شفت و همکاران (۱۳۹۴) نشان دادند که اسانس زنیان علیه باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* و *شریشیا کلی* اثر ضدباکتریایی دارد و ترکیبات عمده‌ی این اسانس متشکل از تیمول (۲۳/۳ درصد)، پارا-سایمن (۱۷/۵ درصد) و گاما-تریپنین (۱۶/۸ درصد) می‌باشند (۳۰).

همچنین صحاف^۱ و همکاران (۲۰۰۷) و محبوبی و کاظم‌پور (۲۰۱۱) در تشابه با نتایج حاصل از پژوهش حاضر نشان دادند که بیشترین ترکیبات تشکیل دهنده اسانس زنیان تیمول، پارا-سایمن و گاما-تریپنین می‌باشند (۳۱، ۳۲). شحات^۲ و همکاران (۲۰۱۱) و رتر^۳ و همکاران (۲۰۱۲) به بررسی ترکیبات اسانس رازیانه پرداختند و نشان دادند که ترانس-انتول، استراگول، لیمون و فنچون بیشترین درصد فراوانی را در میان دیگر ترکیبات تشکیل دهنده اسانس رازیانه دارند (۳۳، ۳۴). به طور کلی بیشتر اجزای این اسانس‌ها را ترکیبات فنلی تشکیل می‌دهند که هم خواص آنتی‌اکسیدانی و هم خواص ضد میکروبی دارند و در نتیجه قابلیت استفاده به عنوان نگهدارنده در مواد غذایی را دارند. تیمول ایزومر کارواکرول (یک مونوترپن فنولی) می‌باشد و تنها اختلاف در محل قرارگیری گروه هیدروکسیل در حلقه فنولیک است. تیمول در اسانس گیاهانی مانند آویشن و زنیان به مقدار فراوان وجود دارد (۳۵). انتول ایزومر استراگول و یک مشتق از فنیل-پروپن است. این ماده نوعی آروماتیک است که به طور گسترده‌ای در اسانس‌های گیاهی یافت می‌شود. ترانس-انتول که به عنوان خلط‌آور در داروهای ضد سرفه و به عنوان تقویت کننده‌ی طعم در صنعت غذا و نوشیدنی مورد استفاده قرار می‌گیرد جز اصلی اسانس رازیانه می‌باشد (۳۶).

برخی از محققان ارتباط بین ساختارهای شیمیایی برخی از اجزاء غالب موجود در اسانس‌ها را با فعالیت ضدباکتریایی آن‌ها گزارش نموده‌اند. بشیر و همکاران (۲۰۱۲)، گزارش کردند که بین ساختار شیمیایی و فعالیت ضد میکروبی اسانس و عصاره ترکیبات طبیعی رابطه وجود دارد. برخی ترکیبات فعال دارای حلقه فنلی برای میکروارگانیزم‌ها سمی محسوب می‌شوند (۳۷). به طور کلی ویژگی آبرگری اسانس‌ها سبب نفوذ آن‌ها در لپید غشاء سلولی و افزایش نفوذپذیری آن می‌گردد، که این امر سبب در اختلال در کلیه فعالیت‌های حیاتی وابسته به غشاء سلولی، خروج یون‌ها، ترکیبات حیاتی و در نهایت مرگ سلول خواهد شد. در واقع مکانیسم عملکرد اسانس‌های گیاهی شامل تخریب دیواره سلولی، صدمه به غشاء سیتوپلاسمی و انعقاد سیتوپلاسم، نشت محتویات سلولی و کاهش شدید ATP داخل سلولی (به علت کاهش سنتز و افزایش هیدرولیز) می‌باشد (۳۸). از طرف دیگر در این بررسی مشاهده شد که اسانس زنیان در مقابل باکتری گرم مثبت *کلستریدیوم اسپروژنز* اثر ضد باکتریایی قوی‌تری نسبت به باکتری گرم منفی *شریشیا کلای* نشان داد که این امر مربوط به تفاوت در ساختار دیواره سلولی باکتری‌های گرم مثبت در مقایسه با باکتری‌های گرم منفی می‌باشد. باکتری‌های گرم مثبت در دیواره سلولی خود دارای ترکیب موکوپتیدی به نام مورن بوده، در حالی که باکتری‌های گرم منفی تنها لایه نازکی از موکوپتید مورن دارند و قسمت اعظمی از ساختار دیواره در آن‌ها لیپوپروتئین و لیپولی ساکارید است. پژوهش‌های مشابه از جمله بهبهانی و همکاران (۲۰۱۳)، جوکی و همکاران (۲۰۱۴)، حیدری سورشجانی و همکاران (۲۰۱۴) در مورد اثر ضد میکروبی عصاره‌ها و اسانس‌های گیاهان دارویی که روی طیف وسیعی از باکتری‌های گرم مثبت و منفی انجام پذیرفته‌است نیز این یافته‌ها را تأیید می‌کنند (۳۹، ۴۰، ۴۱).

در مطالعه حاضر اندازه‌گیری FIC شاخص نشان داد که اسانس‌های زنیان و رازیانه هم در مورد باکتری

3. Rather

1. Sahaf
2. Shahat

کلستریدیوم اسپروژنز و هم در مورد باکتری *اشریشیا کلای* تأثیر متقابلی ندارند. این نتیجه را می‌توان به این امر ارتباط داد که اسانس‌ها به دلیل داشتن ماهیت یکسان محل اثر مشابهی داشته و در نتیجه اثر رقابت و هم افزایی میان آن‌ها ایجاد نمی‌گردد. به طور کلی وقتی مخلوط چند ماده ضد میکروبی همزمان بر جمعیت میکروبی یکنواختی عمل می‌کنند، ممکن است در مقایسه با اثرات انفرادی آن‌ها، منجر به پاسخ ضد میکروبی افزایش یافته، کاهش یافته و یا بدون تغییر شوند. آن دسته از مواد ضد میکروبی که از یک گروه می‌باشند یا دارای مکانیسم عمل یکسان هستند، احتمالاً فقط اثر جمع‌پذیر دارند، درحالی‌که آن‌هایی که مکانیسم عمل متفاوت دارند یا محل اثر آن‌ها متفاوت است، ممکن است اثر هم افزایی یا متضاد داشته باشند. در واقع کاربرد تکنولوژی ترکیبی در نگهداری مواد غذایی، غلظت مواد نگهدارنده را کاهش داده و با افزایش اثرات ضد میکروبی مواد کیفیت محصول و سلامتی آن را بهتر حفظ می‌نماید (۴۲، ۴۳).

مطالعات پیرامون بررسی برهمکنش‌های ترکیبات مختلف و به خصوص اسانس‌های گیاهی در بازدارندگی از رشد میکروارگانیسم‌ها محدود می‌باشد. در مورد ترکیبات طبیعی بیشتر پژوهشگران به بررسی وجود اثرات هم‌افزایی این ترکیبات با آنتی‌بیوتیک‌های متداول پرداخته‌اند، به عنوان مثال براگا و همکاران (۲۰۰۵)، اثر سینرژیستی عصاره انار و آنتی‌بیوتیک‌های آمپی‌سیلین، جنتامایسین و سیپروفلوکسین بر *استافیلوکوکوس اورئوس* را مورد بررسی قرار دادند (۴۴). ساسیداران^۲ و همکاران (۲۰۱۴)، وجود اثر سینرژیستی کورکومین با سه آنتی‌بیوتیک مختلف را در برابر گونه‌های متفاوت باکتری‌های عامل اسهال مورد بررسی قرار دادند. مطالعات اندکی نیز به بررسی اثر برهمکنش میان ترکیبات طبیعی مختلف پرداخته‌اند (۴۵). واتم^۳ و همکاران (۲۰۰۵)، تأثیر همزمان عصاره‌های قره قاط، زغال اخته و دانه انگور بر رشد *هلیکوباکتر پیلوری* را مورد بررسی قرار دادند (۴۶).

یکی از فرضیات توصیف کننده حالت آنتاگونیسمی، مکانیسم بازدارندگی رقابتی^۴ است. هنگامی که دو ترکیب ضد میکروبی دارای جایگاه تأثیر یکسانی در ساختار سلول باشند، اتصال یک ترکیب به جایگاه، از اتصال ترکیب دیگر ممانعت به عمل آورده و مشابه آنچه که در این پژوهش اتفاق افتاد، اثر سینرژیستی مشاهده نگردد. از سوی دیگر ممکن است وجود یک ترکیب با ایجاد تغییراتی در ساختار سلول، اتصال ترکیب دیگر را به جایگاه تسریع و تسهیل نماید در چنین مواردی اثر سینرژیستی بروز می‌کند (۴۷). براساس داده‌های حاصل از این بررسی می‌توان به طور کلی نتیجه گرفت که اسانس‌های زنیان و رازیانه در شرایط آزمایشگاهی دارای قابلیت ضد میکروبی روی سویه‌های مورد مطالعه بودند و اگرچه باکتری گرم منفی *اشریشیا کلای* در مقابل اسانس رازیانه دارای قطر هاله‌ی عدم رشد بیشتری نسبت به باکتری گرم مثبت *کلستریدیوم اسپروژنز* بود اما به طور کلی خاصیت ضد میکروبی زنیان بیشتر از اسانس رازیانه بود که علت این امر را می‌توان به مقدار بالای تیمول در این اسانس مرتبط دانست. همچنین بر اساس FIC شاخص، مشخص گردید ترکیب اسانس‌های زنیان و رازیانه علیه باکتری‌های *کلستریدیوم اسپروژنز* و *اشریشیا کلای* هیچ نوع تأثیری چه از نوع سینرژیستی و چه از نوع آنتاگونیستی نداشت. برای مطالعات آتی پیشنهاد می‌شود که تأثیر اسانس‌های مورد استفاده در این پژوهش توام با دیگر ترکیبات ضد میکروبی همچون اسانس‌ها، آنتی‌بیوتیک‌ها، نانوذرات و... جهت افزایش ماندگاری مواد غذایی مورد بررسی قرار گیرد.

منابع

- Schuenzel KM, Harrison MA. Microbial antagonists of foodborne pathogens on fresh minimally processed vegetables. *Journal of Food Protection*. 2002;65(12):1909-15.
- Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D, Idaomar M. Biological effects of essential oils—a review. *Food and chemical toxicology*. 2008 1;46(2):446-75.
- Han JH. Antimicrobial food packaging. *Novel food packaging techniques*. 2003 Jun 10; 8:50-70.

³. Vattam

⁴. Competitive Inhibitory Mechanism

¹. Braga

². Sasidharan

16. Muriel-Galet V, Cerisuelo JP, López-Carballo G, Lara M, Gavara R, Hernández-Muñoz P. Development of antimicrobial films for microbiological control of packaged salad. *International journal of food microbiology*. 2012 2;157(2):195-201.
17. NCCLS. National Committee for Clinical Laboratory Standard. 2000. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Approved Standard, M7-A5
۱۸. شهنازی سحر، خلیقی سیگارودی فرحناز، اجنی یوسف، یزدانی داراب، اهوازی مریم، تقی زادفرید رحیم. ۱۳۸۶، بررسی ترکیب‌های شیمیایی و خواص ضد میکروبی اسانس حاصل از گیاه آویشن تالشی (Desj. – *Thymus trautvetteri* KLOkov & Shost)، فصلنامه گیاهان دارویی، سال ششم، دوره ۳، ص ۸۰ تا ۸۸
19. Najjar MB, Kashtanov D, Chikindas ML. ε-Poly-l-lysine and nisin A act synergistically against Gram-positive food-borne pathogens *Bacillus cereus* and *Listeria monocytogenes*. *Letters in applied microbiology*. 2007 1;45(1):13-8.
20. Gutierrez J, Barry-Ryan C, Bourke P. The antimicrobial efficacy of plant essential oil combinations and interactions with food ingredients. *International journal of food microbiology*. 2008 May 10;124(1):91-7.
21. Basri DF, Xian LW, Shukor A, Indah N, Latip J. Bacteriostatic antimicrobial combination: Antagonistic interaction between epsilon-viniferin and vancomycin against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *BioMed research international*. 2014;2014.
22. Magi G, Marini E, Facinelli B. Antimicrobial activity of essential oils and carvacrol, and synergy of carvacrol and erythromycin, against clinical, erythromycin-resistant Group a Streptococci. *Frontiers in microbiology*. 2015 3; 6:165.
23. Cushnie TT, Lamb AJ. Antimicrobial activity of flavonoids. *International journal of antimicrobial agents*. 2005 1;26(5):343-56.
24. Dorman HJ, Deans SG. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of applied microbiology*. 2000 1;88(2):308-16.
25. Miguel MG, Cruz C, Faleiro L, Simoes MT, Figueiredo AC, Barroso JG, Pedro LG. *Foeniculum vulgare* essential oils: chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities. *Natural product communications*. 2010;5(2):319-28.
26. Khajeh M, Yamini Y, Sefidkon F, Bahramifar N. Comparison of essential oil composition of *Carum copticum* obtained by supercritical carbon dioxide extraction and hydrodistillation methods. *Food chemistry*. 2004 1;86(4):587-91.
4. Holley RA, Patel D. Improvement in shelf-life and safety of perishable foods by plant essential oils and smoke antimicrobials. *Food Microbiology*. 2005 1;22(4):273-92.
5. Burt S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *International journal of food microbiology*. 2004 1;94(3):223-53.
6. Dalkani M, Darvishzadeh R, Hassani A. Correlation and sequential path analysis in Ajowan (*Carum copticum* L.). *Journal of Medicinal Plants Research*. 2011 Jan 18;5(2):211-6.
7. Arora DS, Kaur GJ. Antibacterial activity of some Indian medicinal plants. *Journal of natural medicines*. 2007 Jul 1;61(3):313-7.
۸. نایینی علیرضا، خسروی علیرضا، تاج بخش حسن، غضنفری طوبی. ۱۳۸۸، بررسی اثرات ضد کاندیدی و ایمونومولتوری اسانس و عصاره‌های گیاه رازیانه (*Foeniculum Vulgare* Mill) در شرایط آزمایشگاهی (In Vitro)، دوماهنامه علمی-پژوهشی دانشور پزشکی، سال شانزدهم، شماره ۸۲، ص ۷ تا ۲۰.
9. Moreira MR, Ponce AG, Del Valle CE, Roura SI. Inhibitory parameters of essential oils to reduce a foodborne pathogen. *LWT-Food Science and Technology*. 2005 1;38(5):565-70.
10. Ghabraie M, Vu KD, Tnani S, Lacroix M. Antibacterial effects of 16 formulations and irradiation against *Clostridium sporogenes* in a sausage model. *Food Control*. 2016 1; 63:21-7.
11. Carson CF, Mee BJ, Riley TV. Mechanism of action of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil on *Staphylococcus aureus* determined by time-kill, lysis, leakage, and salt tolerance assays and electron microscopy. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2002 1;46(6):1914-20.
12. Oroojalian F, Kasma-Kermanshahi R, Azizi M, Bassami MR. Phytochemical composition of the essential oils from three *Apiaceae* species and their antibacterial effects on food-borne pathogens. *Food chemistry*. 2010 1;120(3):765-70.
13. Van Vuuren SF, Suliman S, Viljoen AM. The antimicrobial activity of four commercial essential oils in combination with conventional antimicrobials. *Letters in applied microbiology*. 2009 1;48(4):440-6.
14. Valero M, Salmeron MC. Antibacterial activity of 11 essential oils against *Bacillus cereus* in tyndallized carrot broth. *International journal of food microbiology*. 2003 15;85(1-2):73-81.
15. Ertl P, Robello E, Battaglini F, Mikkelsen SR. Rapid antibiotic susceptibility testing via electrochemical measurement of ferricyanide reduction by *Escherichia coli* and *Clostridium sporogenes*. *Analytical chemistry*. 2000 15;72(20):4957-64.

39. Behbahani BA, Yazdi FT, Mortazavi A, Zendeboodi F, Gholian MM. Effect of aqueous and ethanolic extract of *Eucalyptus camaldulensis* L. Journal of Paramedical Sciences. 2013 19;4(3).
 40. Jouki M, Yazdi FT, Mortazavi SA, Koochehi A. Quince seed mucilage films incorporated with oregano essential oil: physical, thermal, barrier, antioxidant and antibacterial properties. Food Hydrocolloids. 2014 1; 36:9-19.
 41. Heidari Sureshjani M, Tabatabaei Yazdi F, Mortazavi SA, Alizadeh Behbahani B, Shahidi F. Antimicrobial effects of *Kelussia odoratissima* extracts against food borne and food spoilage bacteria" in vitro". Journal of Paramedical Sciences. 2014 17;5(2):5943-.
 42. Bell A. Antimalarial drug synergism and antagonism: mechanistic and clinical significance. FEMS microbiology letters. 2005 1;253(2):171-84.
 43. Nasr A, Kasra KR, Nahvi I. Study the hurdle effect of some organic and chemical food preservation on resistance of *Bacillus cereus* sp. Iranian Food Sciences and Technology Research Journal. 2005;1(2):11-21.
 44. Braga LC, Leite AA, Xavier KG, Takahashi JA, Bemquerer MP, Chartone-Souza E, Nascimento AM. Synergic interaction between pomegranate extract and antibiotics against *Staphylococcus aureus*. Canadian journal of microbiology. 2005 1;51(7):541-7.
 45. Sasidharan NK, Sreekala SR, Jacob J, Nambisan B. In vitro synergistic effect of curcumin in combination with third generation cephalosporins against bacteria associated with infectious diarrhea. BioMed Research International. 2014; 2014:1-8.
 46. Vatter DA, Lin YT, Ghaedian R, Shetty K. Cranberry synergies for dietary management of *Helicobacter pylori* infections. Process Biochemistry. 2005 1;40(5):1583-92.
 47. Chou TC. Theoretical basis, experimental design, and computerized simulation of synergism and antagonism in drug combination studies. Pharmacological reviews. 2006 1;58(3):621-81.
 27. Anwar F, Ali M, Hussain AI, Shahid M. Antioxidant and antimicrobial activities of essential oil and extracts of fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.) seeds from Pakistan. Flavour and Fragrance Journal. 2009;24(4):170-6.
 28. Diao WR, Hu QP, Zhang H, Xu JG. Chemical composition, antibacterial activity and mechanism of action of essential oil from seeds of fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.). Food control. 2014 1;35(1):109-16.
 29. Kazemi M. Phenolic profile, antimicrobial and anti-inflammatory activity of *Carum copticum* L. essential oil. Bulg Chem Commun. 2015 Jan 1; 47:149-55.
۳۰. شفقت مهدیه، نجفی شهلا، رضوی‌زاده. ۱۳۹۴، خواص فیتوشیمیایی و ضد باکتریایی اسانس گیاه دارویی زنیان (*Carum copticum* L. به روش میکرو دایلوژن، فصلنامه بیماری‌های عفونی و گرمسیری، سال بیستم، شماره ۶۸، ص ۴۳ تا ۴۷.
31. Sahaf BZ, Moharramipour S, Meshkatsadat MH. Chemical constituents and fumigant toxicity of essential oil from *Carum copticum* against two stored product beetles. Insect Science. 2007 1;14(3):213-8.
 32. Mahboubi M, Kazempour N. Chemical composition and antimicrobial activity of *Satureja hortensis* and *Trachyspermum copticum* essential oil. Iranian journal of microbiology. 2011;3(4):194.
 33. Shahat AA, Ibrahim AY, Hendawy SF, Omer EA, Hammouda FM, Abdel-Rahman FH, Saleh MA. Chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of essential oils from organically cultivated fennel cultivars. Molecules. 2011 1;16(2):1366-77.
 34. Rather MA, Dar BA, Sofi SN, Bhat BA, Qurishi MA. *Foeniculum vulgare*: A comprehensive review of its traditional use, phytochemistry, pharmacology, and safety. Arabian Journal of Chemistry. 2016 1;9: S1574-83.
 35. Hyldgaard M, Mygind T, Meyer RL. Essential oils in food preservation: mode of action, synergies, and interactions with food matrix components. Frontiers in microbiology. 2012 25; 3:12.
 36. Valgimigli L, Gabbanini S, Cavinia V. Determination of trans-anethole in *Salvia sclarea* essential oil by liquid chromatography and GC-MS. J. Sep. Sci. 2002;25:703-9.
 37. Bachir RG, Benali M. Antibacterial activity of the essential oils from the leaves of *Eucalyptus globulus* against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. Asian Pacific journal of tropical biomedicine. 2012 1;2(9):739-42.
 38. Tajkarimi MM, Ibrahim SA, Cliver DO. Antimicrobial herb and spice compounds in food. Food control. 2010 1;21(9):1199-218.

The Combined Effect of *Carum copticum* (Ajwain) and *Foeniculum vulgare* (Fennel) Essential Oils on *Escherichia coli* and *Clostridium sporogenes* Using Checkerboard Assay

Maryam Heidari Soureshjani¹, **Morteza Khomeiri**^{*1}, Yahya Maghsoudlou¹, Hossein Yousefi², Mahmoud Rafieian³, Mahboubeh Kashiri¹

¹ Department of Food Science and Technology, Faculty of Food Science, University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Golestan, Iran.

² Department of Wood Engineering and Technology, Faculty of Wood and Paper Engineering, University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Faculty of Wood and Paper Engineering, Gorgan, Golestan, Iran.

³ Medical Plants Research Center, Basic Health Science Institute, University of Medical Sciences, Shahrekord, Chaharmahal and Bakhtiari, Iran.

Abstract

Increasing awareness of the adverse effects of chemical preservatives on health has led to an increased tendency to use natural preservatives, especially herbal essential oils in pharmaceutical and food products. *Carum copticum* (Ajwain) and *Foeniculum vulgare* (Fennel) are among the aromatic medicinal plants that can be used in this regard. In this study, the agar diffusion method was used to evaluate and compare the antimicrobial effects of the herbal essential oils in question and the dilution method in the liquid medium was also used to determine the minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC). The checkerboard assay was used to evaluate the interaction between the herbal essential oils of Ajwain and Fennel and to determine the fractional inhibitory concentration. The results showed that the MIC of Ajwain and Fennel herbal essential oils against *Escherichia coli* was 1562.5 µg/ml and 12500 µg/ml, respectively, and in the case of *Clostridium sporogenes* this value was 1562.5 µg/ml and 50000 µg/ml, respectively. Calculation of fractional inhibitory concentration (FIC index) indicated that there was no interaction between the herbal essential oils of two plants against both bacteria in question. In general, the absence of synergistic and antagonistic interactions between the Ajwain and Fennel herbal essential oils can be related to the identically-affected sites of these essential oils in *Escherichia coli* and *Clostridium sporogenes*. Also, the results obtained through the identification of herbal essential oils composition by GC/MS showed that the main components of Ajwain were Thymol (49.96%), p-cymene (22.73%) and γ-Terpinene (15.32%) and in case of Fennel these components were Trans-anethole (63.88%), Estragole (9.97%), limonene (7.65%) and fenchone (5.72%).

Keywords: Antibacterial Effect, Essential Oil, Ajwain, Fennel, Checkerboard

* mkhomeiri@yahoo.com